

巴戟天含药血清对成骨-破骨细胞共育体系原癌基因、核心结合因子 1 mRNA 表达的影响

李芝敏 陈 健¹ 何剑全¹ 张永晟² (福建中医药大学, 福建 福州 350108)

〔摘要〕 目的 观察不同浓度巴戟天含药血清对体外培养成骨-破骨细胞共育体系中原癌基因(C-FOS)、核心结合因子(Cbfa1) mRNA 表达的影响。方法 提取 24 h 内新生 SD 乳鼠颅盖骨分离培养成骨细胞, 采用 5 周龄 SD 大鼠双侧股骨、胫骨的骨髓基质细胞, 加入集落细胞刺激因子(M-CSF)和细胞核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)诱导培养破骨细胞。采用碱性磷酸酶(ALP)染色鉴定成骨细胞, 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色、骨吸收陷窝甲苯胺蓝染色、电镜扫描等鉴定破骨细胞, 体外建构成骨-破骨细胞共育体系, 设置低、中、高三种浓度巴戟天含药血清组和不含药血清组, 干预 3 d 后提取各组总 RNA, 应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法测定各组 C-FOS、Cbfa1 mRNA 表达量。结果 不同浓度巴戟天含药大鼠血清对成骨-破骨细胞共育体系 C-FOS 有抑制作用, 对 Cbfa1 mRNA 的表达有促进作用。高浓度含药血清组两者的表达差异显著($P < 0.05$, $P < 0.0001$)。结论 巴戟天含药血清可抑制成骨-破骨细胞共育体系 C-FOS 的表达, 促进 Cbfa1 mRNA 的表达, 从而达到降低破骨细胞分化成熟及骨吸收活性, 促进骨形成。

〔关键词〕 巴戟天; 成骨-破骨细胞共育体系; 原癌基因(C-FOS); 核心结合因子(Cbfa1)

〔中图分类号〕 R73 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1005-9202(2015)09-2328-04; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2015.09.010

Effects of Morinda officinalis-containing serum on the mRNA expression of C-FOS and Cbfa1 in osteoblast and osteoclast co-cultured system

LI Yi-Min, CHEN Jian, HE Jian-Quan *et al.*

Traditional Chinese Medicine University of Fujian, Fuzhou 350108, Fujian, China

〔Abstract〕 **Objective** To observe the effects of the serum of Morinda officinalis(RMO) on the mRNA expression of C-FOS and core binding factor Alpha1(Cbfa1) in osteoblast and osteoclast co-cultured system. **Methods** Osteoblasts were separated from the cranium of 24 hours newborn SD rat. Bone marrow cells were harvested from bilateral femora and tibiae of five weeks old SD rat, and M-CSF and RANKL were used to induce osteoclast formation. Osteoblast cells were confirmed by alkaline phosphatase(ALP) stain, osteoclast cells were confirmed by tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) stain, Toluidine blue stain and bone resorption assay. Osteoblast and osteoclast co-cultured system was established in vitro. Low, middle, high concentrations of serum RMO and control groups were set. Total RNA was extracted after intervention 3 days, C-FOS and Cbfa1 mRNA expression were measured by real-time PCR. **Results** Different concentrations serum of RMO had inhibitory effect on the expression of C-FOS and enhance the mRNA expression of Cbfa1 mRNA, and the function on both indicated a statistically significant difference at high concentration($P < 0.05$, $P < 0.0001$). **Conclusions** The serum of RMO could down-regulate the expression of C-FOS and up-regulate Cbfa1 mRNA in osteoblast and osteoclast co-cultured system, consequently reduce osteoclast differentiation and activity of bone resorption, enhance bone formation.

〔Key words〕 Morinda officinalis; Osteoblast and osteoclast co-cultured system; C-FOS; Core binding factor Alpha1

巴戟天能够有效减少骨量丢失, 是中医治疗骨质疏松常用的中药之一, 能有效提高去卵巢后大鼠骨密度(BMD)而起到抑制骨吸收作用。但巴戟天的有效成分及作用机制仍不明确。当前巴戟天对成骨(OB)-破骨细胞(OC)共育体系影响的研究甚少, 尤其是对 OC 分化、成熟信号通路原癌基因(C-FOS)以及 OB 分化信号通路核心结合因子(Cbfa1)1 基因的影响未见报道。本文观察巴戟天含药血清对 OB-OC 细胞共育体系的影响, 探讨其抗骨质疏松的分子作用机制。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81272168); 福建省医学创新课题资助项目(No. 2012-CXB-32)

1 厦门大学附属中山医院康复医学科 2 厦门大学医学院

通讯作者: 陈 健(1963-), 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事骨质疏松研究。

第一作者: 李芝敏(1986-), 女, 在读硕士, 主要从事骨质疏松研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料 新生 SD 乳鼠及 5 周龄 SD 大鼠(厦门大学实验动物中心提供(SYXK(闽)2007-0004))。胎牛血清 DMEM 培养基、胰蛋白酶、青霉素、链霉素、II 型胶原酶(Gibco), 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、细胞核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)(Peprotech), 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒(Sigma), 巴戟天颗粒(培力药业有限公司)。

1.2 含药血清制备 选用 9 只正常 SD 大鼠, 每组 3 只, 禁食 12 h 后, 巴戟天溶液灌胃给药, 给药剂量相当于临床等效剂量(根据人和动物体表面积折算的等效剂量比率表计算), 所定低、中、高剂量分别为 0.5, 1, 3 g/kg(1 g 相当于生药 3 g)。给药 2 次/d, 灌胃 3 d, 最后一次服用全天剂量。采血前禁食 12 h, 末次给药 1 h 后将大鼠麻醉, 无菌条件下心脏采血, 室温静置 2 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 同组血清混合, 56℃水浴 30 min 灭活, 分装, -80℃冰箱保存备用。

1.3 不含药血清的制备 选用 3 只正常 SD 大鼠, 只用生理盐

水灌胃,方法同前。

1.4 细胞培养

1.4.1 OB 培养 取新生的SD大鼠乳鼠4只,置于75 %乙醇溶液中浸泡10 min。无菌条件下,取头骨,去除周围软组织及骨膜,剪碎成0.5 mm×0.5 mm大小的骨块,将骨碎片置于含2.5% 乙二胺四乙酸(EDTA)胰酶液中消化30 min,离心弃液加Ⅱ型胶原酶继续消化1 h,每隔10 min 振荡一次,1 h 后离心800 r/min 3 min,并用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬后再次离心(800 r/min 3 min),骨碎片接种于培养皿内,加入4 ml 的DMEM 全培养液,置入37℃、5% CO₂ 培养箱内培养,隔3 d换一次液,等细胞铺满皿底后,采用差速贴壁法将成骨细胞纯化,重复3次后,再置培养箱内培养,隔3 d 换液一次。

1.4.2 OC 培养 按照文献^[1]的方法分离大鼠骨髓基质细胞,加入M-CSF和RANKL 诱导培养OC。

1.5 体外建立OB、OC 共育体系及含药血清干预 培养5 d后分别用胰酶消化OC和第二代OB,将2×10⁴ 个/ml 的OC和2×10⁴ 个/ml 的OB加入6 孔培养板中,充分混匀,制备成细胞悬液,置于37℃、5% CO₂ 培养箱内共育培养2 d。2 d 后更换培养液,改用不同浓度巴戟天含药大鼠血清的培养基与不含药大鼠血清的培养基,继续培养3 d。

1.6 细胞形态特征观察 用显微镜观察培养后的OB、OC 细胞生长形态。

1.7 OB、OC 染色鉴定 将贴有第二代成骨细胞的玻片取出,按说明书进行碱性磷酸酶(ALP) 染色;7 d 后将贴有破骨样细胞的玻片取出,按说明书进行TRAP 染色,中性树胶封固后光镜下观察,TRAP(+) 且细胞核≥3 为破骨细胞。

1.8 OC 骨吸收功能的检测 甲苯胺蓝染色、电镜扫描参考文献^[1] 进行。

1.9 C-FOS、Cbfa1 mRNA 表达的检测 用Trizol(Sigma 公司,美国) 提取各组总RNA,采用紫外分光光度计计算OD260/OD280 比值,确定RNA 纯度。逆转录合成cDNA。PCR 引物序列见表1。内参基因β-actin 作为参照标准序列的设计公司(上海吉玛生物工程公司)。聚合酶链(PCR) 反应混合物: FastStart Universal SYBR Green Master mix(罗氏公司,德国),加蒸馏水至最终体积为50 μl。在实时PCR 扩增仪(ABI7500,美国) 进行PCR 反应,并使用系统(SDS 文件) 进行分析。按上述条件进行扩增循环。采用2^{-ΔΔCT} 方法分析相关基因表达的数据。靶基因= 2^{-ΔΔCT}×控制,ΔΔCT = 治疗组(CT 目的基因-CT 参照基因)-对照组(CT 目的基因-CT 参照基因)。

表1 PCR 引物序列

基因	引物序列	条件	产物长度 (bp)
C-FOS	5'-CCCGTAGACCTAGGGAGGAC-3'	(40) 95℃ 30 s;	234
	5'-GAATACACTCCATGCGGTTG-3'	60℃ 45 s; 72℃ 60 s	
Cbfa1	5'-AGTCCCAACTTCCTGTGCT-3'	(40) 95℃ 30 s;	243
	5'-GGTGAAACTCTTGCCTCGTC-3'	60℃ 45 s; 72℃ 60 s	
β-actin	5'-GAACCCTAAGGCCAACCCTG-3'	(35) 94℃ 45 s; 55℃ ,	315
	5'-AGGCATACAGGACAACACAGC-3'	60 s; 72℃ 60 s	

1.10 统计学分析 使用SPSS18.0 软件进行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 OB 形态观察及鉴定 颅盖骨碎片培养24 h 后,可见少量细胞贴壁生长,呈长梭形,胞质透亮、饱满,48 h 观察细胞数量逐渐增多,相邻骨块长出的细胞开始融合,72 h 后细胞铺满瓶底,贴壁生长良好。第2 代培养24 h 后细胞贴附增殖加快,细胞膨大,呈不规则形或三角形;48 h 后可见大部分细胞贴壁,伸展,成长梭形,3 d 后细胞形态多样化,呈梭形、不规则形、多角形,5 d 后细胞生长紧密连接,融合成片,部分区域重叠生长。细胞传代培养2 d 后经ALP 染色,95% 以上的OB 胞质呈阳性反应,胞质深蓝色,胞质和突起富含黑色颗粒ALP。见图1。

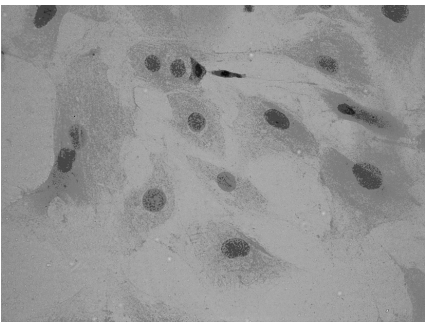
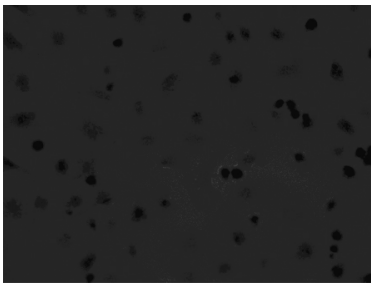
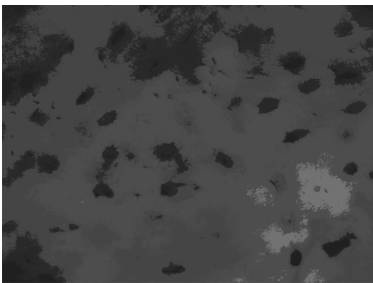


图1 OB 形态及鉴定(ALP 染色,×400)

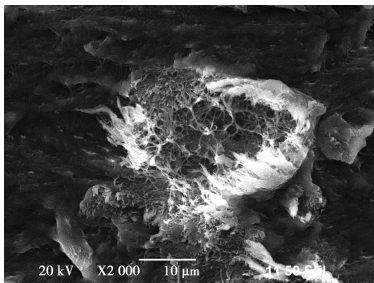
2.2 OC 诱导培养结果及鉴定 如图2 所示,接种24 h 后细胞开始逐渐贴壁,为体积均一的圆形细胞,分布均匀,72 h 后细胞形态多样化,出现多核细胞(圆形、漏斗形、椭圆形或腊肠形等),细胞边缘不规则,有突起和片状或丝状伪足,细胞内可见



TRAP 染色(×100)



骨陷窝甲苯胺蓝染色(×200)



骨陷窝电镜扫描(×2 000)

图2 OC 形态及鉴定

到几个或十几个细胞核,胞质有大小不等的空泡,色淡红,TRAP 染色阳性;OC 形态随着培养时间延长不断发生变化,体积不断增大,细胞数量逐渐增多融合。培养 6 d 后,甲苯胺蓝染色可见陷窝呈圆形、椭圆形、不规则形、腊肠型等多样形态的蓝色或紫蓝色深色区域;电镜扫描可见与正常骨组织相比陷窝明显凹陷,部分陷窝呈串珠样连接,陷窝融合后面积增大,边缘延续成贝壳状或不规则形状,形成纤维基底样形态。

2.3 各组 C-FOS、Cbfa1 mRNA 基因表达的比较 不含药血清组 C-Fos、cbfa1 mRNA 表达量为 1.03 ± 0.29 , 1.01 ± 0.13 ; 低剂量含药血清组分别为 0.70 ± 0.49 , 1.02 ± 0.18 ; 中剂量含药血清组分别为 0.48 ± 0.17 , 1.26 ± 0.05 ; 高剂量含药血清组分别为 0.02 ± 0.02 , 5.55 ± 0.58 。高浓度含药血清组 C-Fos 及 Cbfa1 mRNA 与无含药血清组比较差异显著 ($P=0.0162$, $P<0.0001$)。

3 讨论

OB 和 OC 是骨重建的效应细胞,骨组织新陈代谢的动态平衡是通过 OB 促进骨形成,OC 促进骨吸收来维系的。OB 和 OC 之间的功能活动并不是相互独立的,二者之间的信号交谈对彼此功能的影响至关重要^[2]。近年来中医药干预骨质疏松方面的体外实验,多是采用含药血清单纯对 OB 或 OC 干预实验,并不能代表体内骨代谢的实际情况。本实验采用分别培养 OB 与 OC,然后以 1:1 比例建立共育体系,更符合骨代谢的微环境,便于研究 OB 与 OC 之间的信号交谈及探讨相关信号分子的作用机制。

中药巴戟天具有滋补肝肾,强筋壮骨,祛风除湿等功能。有研究证明,巴戟天能够提高去卵巢大鼠血清钙、磷及护骨素水平;抑制 OC 分化及骨吸收,显著提高去卵巢大鼠股骨的骨密度^[3~6],说明巴戟天能够改善绝经后的骨量丢失,发挥抗骨质疏松作用。鲍蕾蕾等^[7]实验表明巴戟天甲基蒽醌通过抑制 OC 的形成、分化和骨吸收功能来减少骨量丢失。何剑全等^[8]实验发现巴戟天可降低骨质疏松大鼠 OC RANK 和 CA II 的表达,从而达到抑制骨质疏松的作用。还有研究^[9,10]发现巴戟天在一定程度上能够抑制 OB 的凋亡,促进体外培养 OB 增殖。以上研究提示巴戟天抗骨质疏松的作用不单是通过抑制骨吸收,还有促进骨形成。近年来,在骨质疏松防治方面,中医药的研究有很大进展^[11]。

C-FOS 基因是原癌基因的重要成员。其表达产物 C-FOS 蛋白具有多种生物学作用,参调控细胞的生长、增殖、分化等。C-FOS 在 OC 分化过程中起重要的调控作用^[12]。有研究^[13]显示紫穗槐素能够通过下调 C-FOS、活化 T 细胞核因子 (NFATc1) 的表达,阻止 OC 生成。林华等^[14]的实验提示癌基因 C-FOS 与原发性骨质疏松的关系密切,原发性骨质疏松时 C-FOS 表达增高与骨细胞和 OB 的凋亡有关。在代谢性疾病的研究中,发现人参皂甙 Rh2 可控制癌症和其他包括 OC 分化的代谢疾病,其可抑制骨髓巨噬细胞向 OC 分化,显著降低诱导转录因子 C-FOS 和 T 细胞活化的核因子 RANKL 的表达^[15]。研究^[16]发现咖啡酸苯乙酯可抑制 OC 分化形成,且通过抑制 RANKL 及其下游的 NFATc1 和 C-FOS 转导通路抑制 OC 的形成。羧酸通过抑制 OC 前体细胞 C-FOS 蛋白的表达,从而阻止 OC 形成,防止骨

量丢失^[17],说明 C-FOS 基因与骨质疏松的发生密切相关。本研究说明巴戟天含药血清能够通过抑制 C-FOS mRNA 的表达降低骨吸收活性,阻止骨量丢失。

Cbfa1 是骨形成的关键因子,它能上调非 OB 或 OB 前体细胞成骨分化相关基因的表达,使其向 OB 分化^[18]。Cbfa1 在胚胎骨发育期间充质细胞凝集阶段就有表达,此阶段缺失 Cbfa1 将无 OB 形成^[19]。李楠等^[20,21]发现巴戟天多糖能够促进 OB 转化生长因子 $\beta 1$ mRNA、Cbfa1 mRNA 的表达。有研究^[22]表明染料木素可通过 p38 MAPK-Cbfa1 途径,刺激骨髓基质细胞向 OB 分化。Cbfa1 与骨髓基质细胞向 OB 分化过程密切相关,而巴戟天水提物和巴戟天醇提物均能使此过程中 Cbfa1 表达加强,且巴戟天醇提物使 Cbfa1 的表达强于巴戟天水提物,提示巴戟天的作用机制主要是促进骨髓基质细胞成骨分化,从而达到骨形成。本试验中随着巴戟天含药血清浓度的上升,在高浓度时出现统计学差异,说明巴戟天含药血清可以通过加强 Cbfa1 mRNA 的表达促进骨形成。

本实验表明了巴戟天含药血清在这个共育体系中能够显著抑制 OC C-FOS 的表达;巴戟天含药血清能够促进共育体系中 OB 分化,抑制 OC 成熟,从而达到抑制骨吸收,促进骨形成的功能作用。巴戟天抗骨质疏松的详细分子作用机制及具体的有效成分尚不明确,有待进一步研究。

4 参考文献

- 何剑全,陈健.两种大鼠骨髓源破骨样细胞诱导方法的比较[J].中国老年学杂志,2011;31(10):1014-6.
- Stains JP, Civitelli R. Cell-cell interactions in regulating osteogenesis and osteoblast function [J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2005; 75(1): 72-80.
- Li N, Qin LP, Han T, et al. Inhibitory effects of morinda officinalis extract on bone loss in ovariectomized rats [J]. Molecules, 2009; 14(6): 2049-61.
- 朱猛勇,王彩娇,郝长胜.巴戟天多糖对骨质疏松大鼠血清护骨素表达影响的研究[J].现代实用医学,2010;22(7):748-9.
- 朱猛勇,郝长胜,王彩娇.巴戟天多糖对骨质疏松大鼠骨密度及血清微量元素的影响[J].中草药,2010;41(9):1513-5.
- Zhu MY, Wang CJ, Zhang HS, et al. Protective effect of polysaccharides from morinda officinalis on bone loss in ovariectomized rats [J]. Int J Biol Macromol, 2008; 43(3): 276-8.
- 鲍蕾蕾,卞俊,张巧艳,等.巴戟天 2-羟基-3-羟甲基蒽醌对破骨细胞性骨吸收的影响[C].2010 年中国药学会暨第十届中国药师周大会论文集,2010:1-8.
- 何剑全,陈健,郑素玉,等.巴戟天含药血清对原代破骨细胞 RANK 和 CA II mRNA 表达的影响[J].中国骨质疏松杂志,2013;19(5):469-75.
- 李楠,王和鸣,郭素华,等.巴戟天多糖含药血清对体外培养成骨细胞凋亡的保护作用观察[J].中国骨伤,2008;21(1):39-41.
- 李楠,王和鸣,郭素华,等.巴戟天多糖及其水提取物对体外培养成骨细胞活性的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007;23(12):4570-2.
- 何嘉承,林燕萍.中医药对体外破骨细胞功能的干预作用[J].中医正骨,2010;22(9):25-71.
- Huang H, Ryu J, Lee ZH, et al. Induction of c-fos and NFATc1 during

- RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway (J). *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351 (1): 99-105.
- 13 Kim BG, Kwak HB, Choi EY *et al.* Amorphigenin inhibits osteoclast differentiation by suppressing c-fos and nuclear factor of activated T cells (J). *Anat Cell Biol* 2010; 43 (4): 310-6.
 - 14 林 华, 魏海燕, 蒋 青, 等. 原发性骨质疏松骨组织 c-fos、c-jun 和 p53 基因的表达 (J). *中国骨肿瘤骨病* 2003; 23 (6): 368-71.
 - 15 He L, Lee J, Hyuk J *et al.* Ginsenoside Rh2 inhibits osteoclastogenesis through down-regulation of NF- κ B, NFATc1 and c-fos (J). *Bone* 2012; 50 (6): 1207-13.
 - 16 Ha J, Choi HS, Lee Y *et al.* Caffeic acid phenethyl ester inhibits osteoclastogenesis by suppressing NF κ B and downregulating NFATc1 and c-fos (J). *Int Immunopharmacol* 2009; 9 (6): 774-80.
 - 17 Lee JH, Kim HN, Yang D *et al.* Trolox prevents osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression and signaling (J). *J Biol Chem* 2009; 284 (20): 13725-34.
 - 18 Ducy P, Zhang R, Geoffroy V *et al.* Osf2 /Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation (J). *Cell* 1997; 89 (5): 747-54.
 - 19 Karsenty G, Ducy P, Starbuck M *et al.* Cbfa1 as a regulator of osteoblast differentiation and function (J). *Bone* 1999; 25 (1): 107-8.
 - 20 李 楠, 王和鸣, 郭素华, 等. 巴戟天多糖对体外培养成骨细胞核心结合因子 Cbfa1 mRNA 表达的影响 (J). *中华中医药杂志* 2007; 22 (8): 517-9.
 - 21 王和鸣, 王 力, 李 楠. 巴戟天对骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程 Cbfa1 表达的影响 (J). *中国中医骨伤科杂志* 2004; 12 (6): 22-6.
 - 22 Liao QC, Xiao ZS, Qin YF *et al.* Genistein stimulates osteoblastic differentiation via p38 MAPK-Cbfa1 pathway in bone marrow culture (J). *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28 (10): 1597-602.

(2014-10-09 修回)

(编辑 冯 超/曹梦园)

神经根回植联合细胞移植治疗大鼠臂丛神经根性撕脱伤的作用

李晓涛 李长德 解云川 孙国娟 (佳木斯大学附属第一医院 黑龙江 佳木斯 154002)

〔摘 要〕 目的 研究神经根回植联合细胞移植治疗大鼠臂丛神经根性撕脱伤的治疗作用。方法 随机将实验大鼠分成3组: A组(颈神经根撕脱组)、B组(颈神经根撕脱后回植组)、C组(颈神经根撕脱后回植联合神经干细胞(NSCs)与雪旺细胞(SCs)移植组); 于术后不同时间点观察实验大鼠患肢功能恢复情况及相应脊髓损伤节段前角运动神经元的存活率。结果 术后1~8 w, B、C组患肢活动功能恢复情况较A组明显改善; 各组脊髓前角运动神经元存活率比较: A组<B组<C组, 组间进行两两比较有显著性差异($P<0.05$)。结论 神经根回植术联合细胞移植能够改善受伤大鼠的患肢功能, 对损伤局部的神经元提供支持、保护和营养作用, 可以挽救局部濒死的神经元, 减少损伤局部细胞的死亡。

〔关键词〕 神经干细胞; 雪旺细胞; 移植; 臂丛神经

〔中图分类号〕 R74 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1005-9202(2015)09-2331-03; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2015.09.011

交通伤、高空坠落等高能创伤较以往有大幅度增长, 上臂丛神经根性撕脱伤患者上肢的功能将不同程度的丧失, 以往临床上多采取撕脱的神经根回植或其他神经移位等手术方法治疗伤者, 但疗效一般。上世纪末, 人们发现神经干细胞(NSCs)具有分化的潜能, 这改变了之前的人们对中枢神经系统神经细胞不可再生的认识, 也给为人们利用 NSCs 的移植治疗神经系统疾病提供了新的思路。雪旺细胞(SCs)是周围神经的胶质细胞, 其功能活跃, 能分泌多种神经营养因子, 对周围神经的生长、发育及功能的保持起到重要作用。当周围神经损伤后, 其对于神经的再生与修复也起到至关重要的作用。本研究通过实验观察 NSCs 与 SCs 共移植对臂丛神经根性撕脱伤大鼠患肢功能的影响以及损伤局部神经元的存活情况, 综合评价细胞移植的疗效, 进而阐明细胞移植治疗作用的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 Wistar 大鼠 60 只, 鼠龄 (60 \pm 5) d, 体重 (250 \pm 20) g, 健康清洁级, 随机分为3组, 每组20只, A组(颈神经根撕脱组)、B组(颈神经根撕脱后回植组)、C组(颈神经根撕脱后回植联合 NSCs 与 SCs 移植组)。

1.2 主要试剂 DMEM/F12、B27 (Gibco 公司), 小鼠抗大鼠 BrdU 抗体、小鼠抗大鼠 Nestin 抗体、FITC 标记羊多克隆抗体 (Sigma 公司), S-100 抗体、鼠抗大鼠 GFAP 抗体、小鼠抗大鼠 MAP-2 抗体、SABC 免疫组化试剂盒 (武汉博士德公司)。

1.3 实验方法 A、B、C组均制备成臂丛神经根性撕脱伤模型, 手术方法参照朱清远等^[1]的制备方法。方法如下: 取颈椎后正中切口, 依次切开皮肤、皮下组织及深筋膜, 以 C2 及 C7 棘突确定椎体及神经根次序, 沿中线向右侧或左侧分离棘旁肌肉组织, 手术显微镜下显露硬脊膜和固定 C5、C6、C7 神经根, 将 C5、C6、C7 神经根予以撕脱, 操作应轻柔, 然后将 C6 神经根残端标记后埋于棘突旁肌肉组织内, 再将撕脱的 C5、C7 神经根剪除 1.5~2.0 mm 后分别予以旷置。大鼠模型制备后 1 w, A组局部显露后注入与移植细胞同体积的生理盐水; B组行神经根回植术并局部注入与移植细胞同体积的生理盐水; C组行神经根回植及细胞移植术。神经根回植方法如下: 沿原手术切口切

基金项目: 黑龙江省自然科学基金(H201359); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12521538)

通讯作者: 孙国娟(1976-), 女, 主管护师, 主要从事脊柱外科患者围术期护理的研究。

第一作者: 李晓涛(1974-), 男, 博士, 副主任医师, 主要从事周围神经损伤与修复研究。